Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 2, June. July. 2017, p. 426- 435

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۶ ص.۴۳۵-۴۲۶

مقاله کوتاه پژوهشی

بررسی اثر حلال‌های مختلف بر استخراج کاروتنوئیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی از کدو حلوایی

جواد مهدی‌زاده مقدم[1]- سمیه رحیمی[2]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳

چکیده

کدو حلوایی از جمله محصولات کشاورزی است که علیرغم قیمت بسیار پایین، به‌عنوان منبع غنی از انواع کاروتنوئیدها که خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند، شناخته می‌شود؛ بر این اساس در این پژوهش به‌منظور استخراج کاروتنوئیدها از کدو حلوایی که به چهار حالت خام، پخته، خشک‌شده و یا پخته و خشک شده بودند، از حلال‌های مختلفی نظیر هگزان، استون، اتانول، نسبت ۱:۱ و نسبت ۱:۱:۱ حجمی هر یک از حلال‌ها استفاده شد. در ادامه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده نیز بر مبنای قدرت مهارکنندگی DPPH اندازه‌گیری و محاسبه گردید. بررسی نتایج نشان داد که حلال‌های مختلف اثر معنی‌داری بر استخراج کاروتنوئیدها از نمونه‌های مختلف کدو حلوایی داشته‌اند ($p<0/05$) به‌طوری که بیشترین استخراج کاروتنوئیدها با استفاده از حلال هگزان در کدوی پخته و خشک‌شده برابر با ۱۶/۷۴ میکروگرم/ گرم حاصل گردید که پس از آن نسبت ۱:۱ (حجمی) از حلال‌های هگزان: استون بیشترین توانایی استخراج کاروتنوئیدها را در تمامی نمونه‌های کدو از خود نشان دادند. از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز اثر حلال در تمامی عصاره‌های کاروتنوئیدی استحصال شده معنی‌دار بود ($p<0/05$) که عصاره کدوی خام به‌دست آمده از نسبت ۱:۱ (حجمی) هگزان: استون، فعالیت مهارکنندگی DPPH قابل توجهی را از خود نشان داد (۶۳/۱۴٪).

واژه‌های کلیدی: کدو حلوایی، استخراج، کاروتنوئید، حلال آلی، قدرت مهارکنندگی DPPH.

مقدمه

رنگ‌های طبیعی ترکیباتی هستند که ممکن است به‌طور مستقیم از منابع طبیعی حاصل شوند و یا این که از طریق سنتز عصاره‌هایی با منشاء طبیعی، تهیه شوند و به‌طور کلی افزودن آن‌ها، به محصولات غذایی کاملاً مجاز و آزاد است (گریفیث، ۲۰۰۵). یکی از مهم‌ترین رنگ‌های طبیعی، کاروتنوئیدها هستند که به‌طور طبیعی در کلروپلاست و یا کروموپلاست گیاهان و برخی از ارگانیسم‌های فتوسنتزکننده مثل جلبک‌ها یافت می‌گردند (نورشازیلا و همکاران، ۲۰۱۲). کاروتنوئید یک رنگدانه آلی تتراترپنوئیدی است که به لیکوپن، بتا-کاروتن، لوتئین، زی‌زانتین، بتا-کریپتوزانتین و آلفا-کاروتن تقسیم‌بندی می‌شود (ایشیدا و چاپمن، ۲۰۰۸).

طبق گزارشات، تقاضای بازار جهانی برای کاروتنوئیدها دارای رشدی معادل ۲/۹٪ در سال است و اگرچه اغلب کاروتنوئیدهایی که به‌طور تجاری فروخته می‌شوند از سنتز شیمیایی مشتق شده‌اند و نمی‌توانند با انتظارات مصرف‌کنندگان مبنی بر مصرف کاروتنوئیدهای طبیعی انطباق داشته باشند؛ لذا محققان توجه خود را از سنتز شیمیایی کاروتنوئیدها، به جداسازی آن‌ها از منابع زیستی معطوف داشته‌اند (گو و همکاران، ۲۰۰۸). کاروتنوئیدها منبع مهمی از ویتامین آ هستند که برای دید عادی چشمان و رشد و نمو جنین مورد نیاز اند (سئو و همکاران، ۲۰۰۵)؛ علاوه بر این، می‌توانند موجب کاهش خطر ابتلا به برخی امراض مهلک مثل سرطان و بیماری‌های قلبی- عروقی گردند (نورشازیلا و همکاران، ۲۰۱۲؛ ایشیدا و چاپمن، ۲۰۰۸).

کدو یک میوه گرد-شکل از خانواده Cucurbitaceae و جنس

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران.
۲- استادیار، گروه صنایع غذایی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: s.rahimi@irost.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.48796

Cucurbita است که در تمام دنیا روییده و به‌عنوان غذا، خوراک دام و یا مصارف تزیینی کاربرد دارد (شی و همکاران، ۲۰۱۰). کدو محصولی است که به‌راحتی ذخیره و حمل و نقل شده، در تمام پائیز و زمستان با قیمت ناچیزی در دسترس است (سئو و همکاران، ۲۰۰۵). مسئول رنگ نارنجی کدو، حضور کاروتنوئیدها به‌صورت رنگدانه‌های طبیعی در ساختار آن است (عزیزه و همکاران، ۲۰۰۹) که عمدتا شامل بتا-کاروتن و لیکوپن هستند (نورشازیلا و همکاران، ۲۰۱۲)؛ لذا علاقه صنعتی قابل توجهی برای استخراج کاروتنوئیدها از کدو به‌منظور توسعه ترکیبات غذایی طبیعی و عملگرا وجود دارد (شی و همکاران، ۲۰۱۰).

کاروتنوئیدها عموما با استفاده از حلال‌های آلی از مواد گیاهی استخراج می‌شوند که علت آن نیز ماهیت آبگریزی آن‌ها و حلالیت محدودشان در آب است (ایشیدا و چاپمن، ۲۰۰۸). در خصوص استخراج انواع کاروتنوئیدها از بافت‌های گیاهی نظیر هویج (بارث و همکاران، ۱۹۹۵)، پودر گوجه‌فرنگی خشک و ذرت (ایشیدا و چاپمن، ۲۰۰۸) تحقیقاتی صورت پذیرفته‌اند. در مورد استخراج کاروتنوئیدها از کدو حلوایی نیز تاکنون تعداد اندکی از مطالعات گزارش شده اند. سئو و همکاران (۲۰۰۵) با روش‌های استخراج مایع-مایع و سیال فوق بحرانی، کاروتنوئیدهای کدو را استخراج و سپس با کمک کروماتوگرافی فاز معکوس آن‌ها را اندازه‌گیری نمودند. طبق نتایج آن‌ها بتا-کاروتن، کاروتنوئید غالب در کدو بوده (>۸۰٪) که همراه با آن مقادیر کمتری از سایر کاروتنوئیدها نیز اندازه‌گیری شدند (سئو و همکاران، ۲۰۰۵). شی و همکاران از روش استخراج با دی‌اکسید کربن فوق بحرانی و حلال آلی برای استخراج کاروتنوئیدها از کدو سود جستند که مطابق با نتایج آن ها بتا-کاروتن بیشترین مقدار (۴۰-۳۱ گرم در هر ۱۰۰ گرم از کاروتنوئید کل) را در بین تمامی کاروتنوئیدها به‌خود اختصاص داد (شی و همکاران، ۲۰۱۰). محققان در سال ۲۰۱۲ با استفاده از حلال استون و روش های کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری، کاروتنوئید کل، آلفا-کاروتن، بتاکاروتن و ایزومرهای آن ها را در دو نمونه از کدو مورد اندازه گیری قرار دادند (کاروالهو و همکاران، ۲۰۱۲).

لذا در این پژوهش تلاش شد تا از کدو به‌عنوان منبعی ارزان‌قیمت برای استخراج رنگ خوراکی طبیعی استفاده شود تا بلکه بتوان جایگاه کشت و تولید آن را در بخش کشاورزی کشور به‌عنوان محصولی مفید، مقاوم و سریع‌الرشد ارتقا بخشید. در این تحقیق کاروتنوئیدها با به‌کارگیری سه نوع حلال با قطبیت‌های مختلف (هگزان، استون و اتانول) و همچنین نسبت‌های ترکیبی آن‌ها در کدوهای خام، پخته، خشک و یا پخته و خشک‌شده استخراج شدند که در نهایت نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های کدو

کدوهای رسیده (*Cucurbita moschata*) کشت شده در مزرعه شخصی، پس از شستشو، به قطعات کوچکی خرد شده، پوستگیری و دانه‌گیری شدند. از آن‌جایی که استخراج کاروتنوئیدها از چهار دسته کدو یعنی خام، پخته، خشک‌شده و پخته و خشک‌شده باید صورت می‌پذیرفت لذا بدین منظور اقدامات دیگری نیز جهت آماده‌سازی آن‌ها انجام شد. کدوهای خام و یا پخته، پس از آماده‌سازی درون خردکن (پارس خزر، ایران)، کاملا به‌صورت خمیر در آمده و برای تهیه کدوی خشک‌شده نیز در ابتدا کدوها به‌صورت ورقه‌های باریکی برش داده شده و در دمای پایین خشک شدند که سپس کاملا پودر شدند. برای تهیه نمونه‌های کدوی پخته و خشک شده نیز پس از پختن کدوها، نمونه‌ها خشک و سپس پودر شدند. کلیه نمونه‌های کدو درون ظروف شیشه‌ای تیره دربدار در یخچال جهت استخراج کاروتنوئید نگهداری شدند.

استخراج کاروتنوئیدها

به‌منظور استخراج کاروتنوئیدها، در ابتدا مقدار ۱۰ گرم از نمونه‌های کدو توزین شده و سپس حلال (هگزان، استون، اتانول، نسبت ۱:۱ استون: اتانول، نسبت ۱:۱ هگزان: استون، نسبت ۱:۱ هگزان: اتانول و نسبت ۱:۱:۱ هگزان: استون: اتانول) به آن اضافه شد (۲ برابر وزنی). برای افزایش سرعت استخراج نمونه‌ها به کمک همزن مغناطیسی (Heidolph، آلمان) همزده شدند و به‌منظور جلوگیری از واکنش کاروتنوئیدها با نور و یا تبخیر حلال، تمام اطراف بشر با فویل پوشانیده شد. پس از بیرنگ شدن کامل کدوها، حلال حاوی کاروتنوئید به دستگاه تبخیرکننده گردان (Heidolph، آلمان) منتقل شد تا محلول غلیظی به حجم تقریبی ۵ سی‌سی به‌دست آید که دور از نور و درون یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری مقدار کاروتنوئید کل

برای اندازه‌گیری مقدار کاروتنوئید کل از روش اسپکتروفتومتری مطابق با روش کاروالهو و همکاران (۲۰۱۲) استفاده شد. بدین منظور، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر (Unico، مدل UV-2150، ،امریکا)، قرائت گردیده و با استفاده از رابطه زیر مقدار کاروتنوئید کل محاسبه شد.

$$\text{کل کاروتنوئید} = (\mu g/g) = \frac{A \times V \times 10^4}{A_{1\,cm}^{1\%} \times P} \quad (1)$$

که در آن A میزان جذب نمونه، V حجم کل عصاره (بر حسب میلی‌لیتر)، P وزن نمونه (بر حسب گرم) و $A_{1cm}^{1\%}$ نیز ضریب ثابت مربوط به بتاکاروتن و معادل عدد ۲۵۹۲ است (کاروالهو و همکاران، ۲۰۱۲).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاروتنوئیدی به‌دست آمده از روش قدرت مهارکنندگی DPPH استفاده شد. بدین منظور مطابق با روش پراساد و همکاران (۲۰۱۱)، در ابتدا ۰/۵ سی‌سی از عصاره کاروتنوئیدی به لوله آزمایش منتقل و سپس ۱ سی‌سی از محلول ۰/۲ میلی‌مولار DPPH (تهیه شده در متانول) به آن اضافه گردید. سپس نمونه کاملا با فویل پوشانیده شده و بر روی همزن مغناطیسی با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه هم خورده و مخلوط شد. میزان جذب نمونه‌ها و نمونه شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گشته و درصد قدرت مهارکنندگی DPPH با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$DPPH\ \text{قدرت مهارکنندگی} = \frac{(OD_{\text{شاهد}} - OD_{\text{نمونه}})}{OD_{\text{شاهد}}} \times 100 \qquad (۲)$$

لازم به توضیح است که نمونه شاهد، نمونه عاری از کاروتنوئید می‌باشد (پراساد و همکاران، ۲۰۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

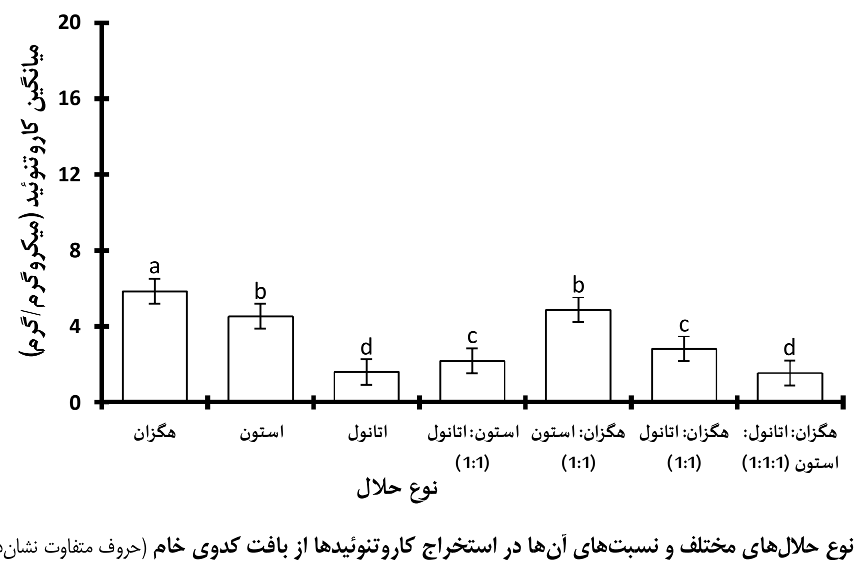
در این تحقیق، از طرح کاملا تصادفی برای انجام کلیه آزمون‌ها با حداقل ۳ تکرار، استفاده شده و تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز به روش تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و با کمک نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام شد که در صورت معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها نیز نرم‌افزار Excel (۲۰۰۷) به‌کار برده شد.

نتایج و بحث

نتایج استخراج کاروتنوئید از نمونه‌های کدو حلوایی

الف) کدو حلوایی خام

در نمودار شکل (۱) تاثیر معنی‌دار کاربرد حلال‌های مختلف در استخراج کاروتنوئیدها از بافت کدوی خام مشاهده می‌شود (p< ۰/۰۵). همانطور که مشخص است در خصوص کاربرد حلال‌ها به تنهایی، حلال هگزان بیشترین تاثیر را در استخراج داشته (۵/۸۶ میکروگرم/ گرم) در حالی که حلال اتانول کم‌ترین بازده استخراج (۱/۶۰ میکروگرم/ گرم) را نشان می‌دهد. قابل توجه است که علیرغم انتظار، ترکیب حلال‌های مختلف با نسبت‌های ۱:۱ و یا ۱:۱:۱ نیز نتوانسته است بر راندمان استخراج کاروتنوئیدها بیفزاید و اختلاف معناداری بین آن‌ها مشاهده می‌شود.

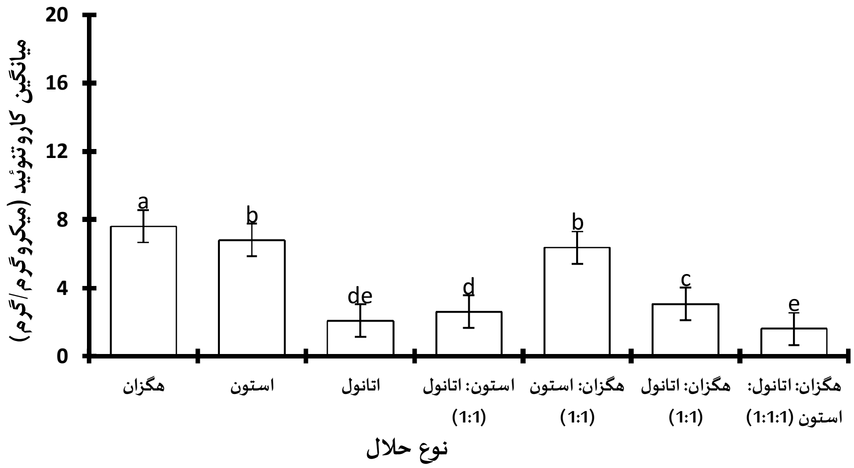


شکل ۱- نمودار تاثیر نوع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در استخراج کاروتنوئیدها از بافت کدوی خام (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

ب) کدو حلوایی پخته

مطابق با شکل (۲)، حلال هگزان قادر بوده است بیشترین مقدار کاروتنوئید را از بافت کدوی پخته استخراج نماید که بیشترین راندمان را در قیاس با سایر حلال‌های مورد استفاده نیز نشان می‌دهد (مشابه کدوی خام). این نکته قابل توجه است که قدرت استخراج کاروتنوئیدها از کدوی پخته بیش از کدوی خام بوده است که علت آن را می‌توان

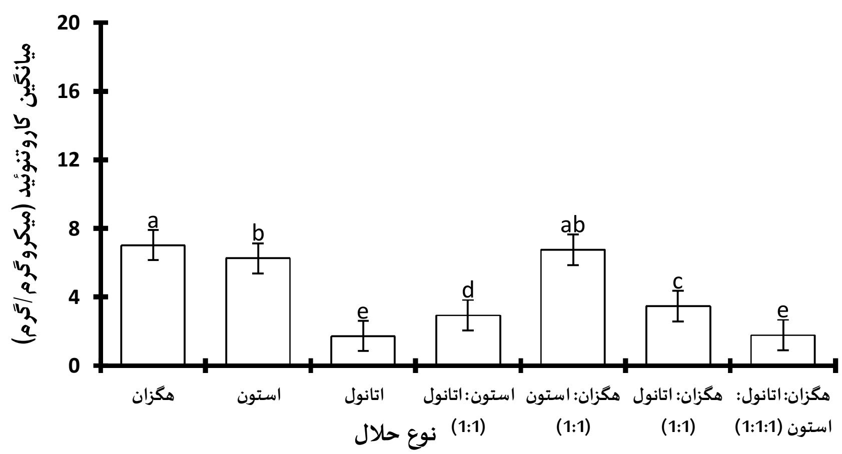
به خروج مقداری از رطوبت و یا نرم‌تر شـــدن بافت کدو طی عملیات پخت نسبت داد که عملیات انتقال جرم و استخراج را تسهیل می‌نماید.



شکل ۲- نمودار تاثیر نوع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در استخراج کاروتنوئیدها از بافت کدوی پخته (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

پ) کدو حلوایی خشک‌شده

مشابه موارد قبل، حلال هگزان (۷/۰۲ میکروگرم/ گرم) و ترکیب ۱:۱ حلال هـای هگزان: اســـتون (۶/۷۶ میکروگرم/ گرم) توانـایی بیشـتری در اسـتخراج کاروتنوئیدها از کدوی خشک‌شده نشان دادند. قابل توجه است که میزان استخراج کاروتنوئیدها در کدوی خشک‌شده در قیـاس بـا کـدوی پخته، قدری کاهش یافته اســت که علت آن می‌تواند درشـت بودن اندازه ذرات کدو پس از خشک کردن و آسیاب کردن باشـــد که به علت کاهش ســـطح تماس، اثر منفی بر راندمان استخراج گذاشته است.

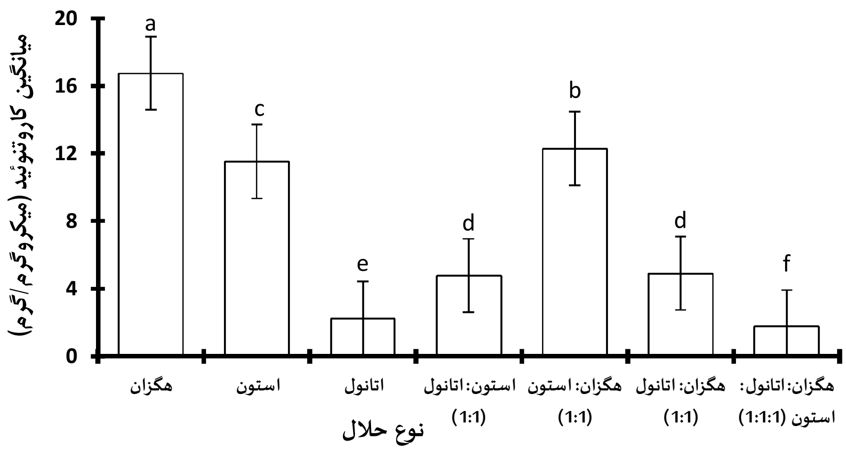


شکل ۳- نمودار تاثیر نوع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در استخراج کاروتنوئیدها از بافت کدوی خشک‌شده (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

ت) کدو حلوایی پخته و خشک شده

مطابق با نمودار شـــکل (۴) و مشـــابه موارد قبل، حلال هگزان توانایی قابل توجهی در اسـتخراج کاروتنوئیدها از خود نشـان می‌دهد (۱۶/۷۴ میکروگرم/ گرم) کـه بیش از دو برابر مقـدار کـاروتنوئیـد اسـتخراج شده از کدوی پخته با استفاده از همین حلال است. پس از هگزان، ترکیب ۱:۱ هگزان: استون (۱۲/۳۰ میکروگرم/ گرم) و سپس حلال استون به تنهایی (۱۱/۵۳ میکروگرم/ گرم) بیشترین تاثیر را در اسـتخراج نشـان دادند. قابل توجه است که ترکیب سه حلال هگزان:

اتانول: استون دارای کم ترین توانایی استخراج در سطح اطمینان ۹۵٪ می باشد.



شکل ٤- نمودار تاثیر نوع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در استخراج کاروتنوئیدها از بافت کدوی پخته و خشک شده (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

به‌طور کلی می‌توان بیان نمود که بیشترین استخراج کاروتنوئیدها در این تحقیق، با استفاده از حلال هگزان در کدوی پخته و خشک‌شده برابر با ۱۶/۷۴ میکروگرم/ گرم حاصل گردید که البته نتیجه حاصل شده متفاوت از نتایج سایر پژوهشگران است. محققان در سال ۲۰۱۲ بیشترین مقدار کاروتنوئید کل را در نمونه های کدو حلوایی خام گونه *Cucurbita moschata* (مشابه گونه کدوی مورد استفاده در این تحقیق) استخراج شده با حلال استون را برابر با ۴۰۴/۹۸ میکروگرم/ گرم گزارش نمودند؛ در حالی که در مطالعات قبلی مقدار کاروتنوئید کل در ۲۲ رقم از گونه کدوی فوق، در محدود ۷/۰۲ تا ۱۳۸/۵۶ میکروگرم/ گرم ثبت گردیده است (کاروالهو و همکاران، ۲۰۱۲). در تحقیق دیگری نیز مقدار استخراج کاروتنوئیدها از کدو با گونه مشابه فوق و با استفاده از نسبت ۱:۱ از استون: پترولئوم اتر، برابر با ۱۲۱/۲۱ میکروگرم/ گرم به‌دست آمد (نورشازیلا و همکاران، ۲۰۱۲).

تاکنون از حلال‌های آلی مختلفی برای استخراج کاروتنوئیدها از منابع مختلف استفاده شده است که معمولا پیشنهاد مناسب‌ترین حلال، به دلیل تفاوت در قطبیت انواع کاروتنوئیدهای مختلف، پیچیدگی ساختار ماتریکس (بافت) نمونه و ترکیبات موجود در آن، به‌سادگی امکان‌پذیر نیست. معمولا حلال‌های غیرقطبی مثل هگزان انتخاب خوبی برای استخراج کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیر کاروتن‌ها هستند در حالی که حلال‌های قطبی مانند اتانول و استون برای کاروتنوئیدهای غیرقطبی نظیر گزانتوفیل‌ها مناسب‌تر هستند (آموریم-کاریلهو و همکاران، ۲۰۱۴). از میان حلال‌های مورد استفاده جهت استخراج کاروتنوئیدها در این پژوهش، اتانول بیشترین قطبیت را داشته (دارای یک سر قطبی و یک سر غیرقطبی) و پس از آن استون و سپس هگزان قرار دارند؛ به عبارت دیگر، به‌طور کلی هگزان به‌عنوان یک حلال کاملا غیرقطبی شناخته می‌شود. به سبب آن که اغلب ترکیبات قطبی در حلال‌های قطبی و ترکیبات غیرقطبی در حلال‌های غیرقطبی حل می‌شوند، بنابراین انحلال و استخراج قابل توجه کاروتنوئیدهای غیرقطبی موجود در کدو که به‌طور عمده شامل بتا و آلفاکاروتن هستند، را می‌توان به خوبی در هگزان توجیه و تفسیر نمود. علیرغم انتظار، ترکیب حجمی حلال‌های فوق (نسبت‌های ۱:۱ و ۱:۱:۱) نیز نتوانست بازده قابل توجهی از استخراج را نشان دهد؛ البته قابل ذکر است که در اغلب موارد ترکیب ۱:۱ هگزان: استون که در مجموع قطبیت بسیار کمی دارد، نیز راندمان خوبی را در استخراج از خود نشان داد.

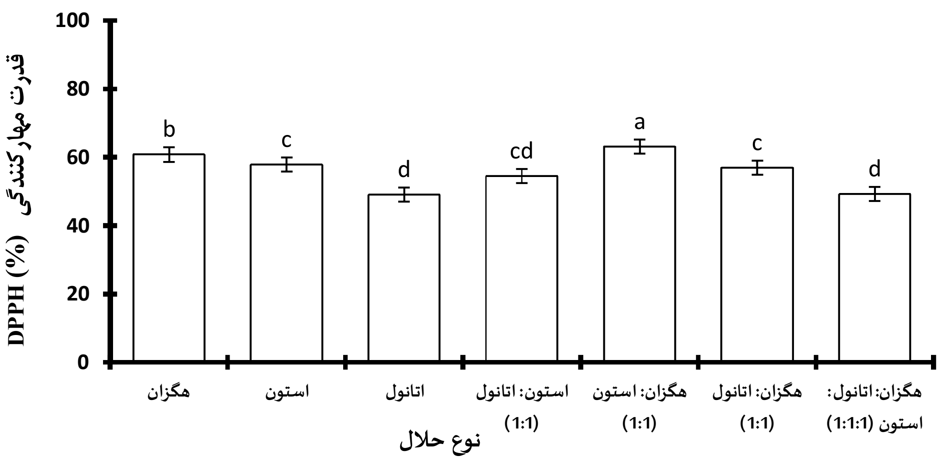
بررسی میزان استخراج کاروتنوئیدها از نمونه‌های مختلف کدو حلوایی شامل کدوی خام، پخته، خشک‌شده و پخته و خشک‌شده، موید این مطلب بود که کدوی پخته و خشک‌شده بیشترین توانایی استخراج را از خود نشان می‌دهد (بیش از دو برابر بازده استخراج از سایر نمونه‌ها) که پس از آن کدوی پخته و سپس کدوی خشک شده و در نهایت کدوی خام قرار دارند. علت بهبود فرآیند استخراج را با عملیات پخت می‌توان به نرم‌تر شدن بافت کدو نسبت داد که انتقال جرم و استخراج را تسهیل می‌نماید. خشک کردن نیز باعث خروج رطوبت از بافت کدو شده و در نتیجه چون مقدار ماده خشک افزایش یافته است، لذا بر میزان راندمان استخراج نیز افزوده می‌گردد. لذا ترکیب این دو عامل که برای کدوی پخته و خشک‌شده اعمال شده است، در مجموع سبب شده است تا راندمان استخراج در آن تا حد قابل توجهی افزایش یابد. تامپسون و همکاران (۲۰۰۰) گزارش نمودند

که طی استخراج کاروتنوئید لیکوپن از گوجه‌فرنگی خام و پخته، مقدار لیکوپن در گوجه‌فرنگی‌های پخته شده بیشتر از گوجه‌فرنگی‌های خام بود ولی این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است (تامپسون و همکارن، ۲۰۰۰) که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاروتنوئیدی نمونه‌های کدو حلوایی

الف) کدو حلوایی خام

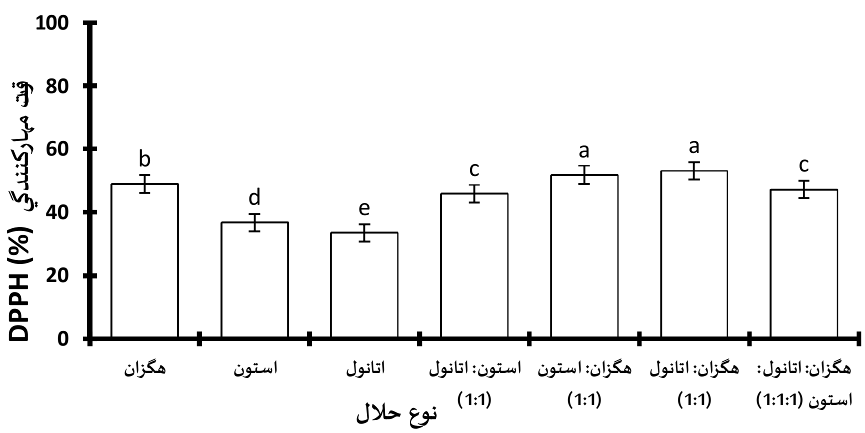
به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از نمونه‌های کدو، از آزمون DPPH استفاده شد که در این روش، قدرت مهارکنندگی این ترکیب را به خواص آنتی‌اکسیدانی آن نسبت می‌دهند. همانطور که در نمودار شکل (۵) مشاهده می‌شود تمامی عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از کدوی خام، خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان دادند و بیشترین قدرت مهارکنندگی در ترکیب دو حلال هگزان: استون (۱:۱) برابر با ۶۳/۱۴٪ مشاهده گردید که اختلاف معناداری را با سایر نمونه‌ها نشان می‌دهد (p <۰/۰۵).



شکل ۵- نمودار قدرت مهارکنندگی DPPH عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از انواع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در کدوی خام (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

ب) کدو حلوایی پخته

مطابق با نمودار شکل (۶) مربوط به عصاره کاروتنوئیدی به‌دست آمده از کدوی پخته نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی حاصل گردید که تفاوت کمی با نمونه‌های مربوط به کدوی خام دارد.

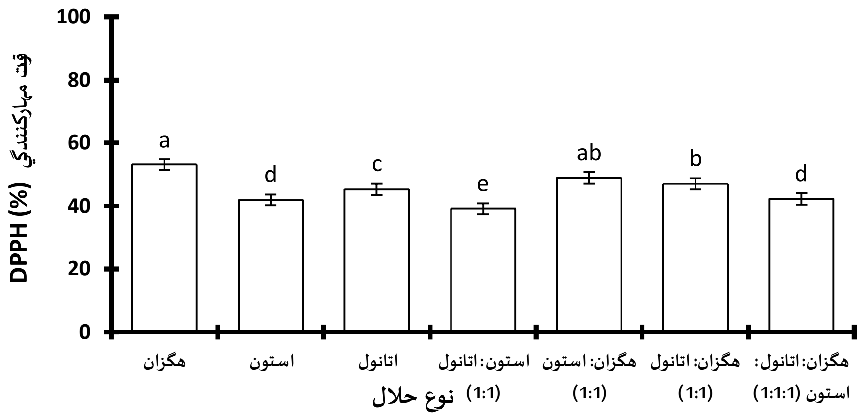


شکل ٦- نمودار قدرت مهارکنندگی DPPH عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از انواع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن ها در کدوی پخته (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

پ) کدو حلوایی خشک‌شده

عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از کدوی خشک شده نیز قدرت مهارکنندگی DPPH قابل توجهی را نشان دادند و عصاره کاروتنوئیدی به‌دست آمده از هگزان در این راستا، قابلیت بالایی را

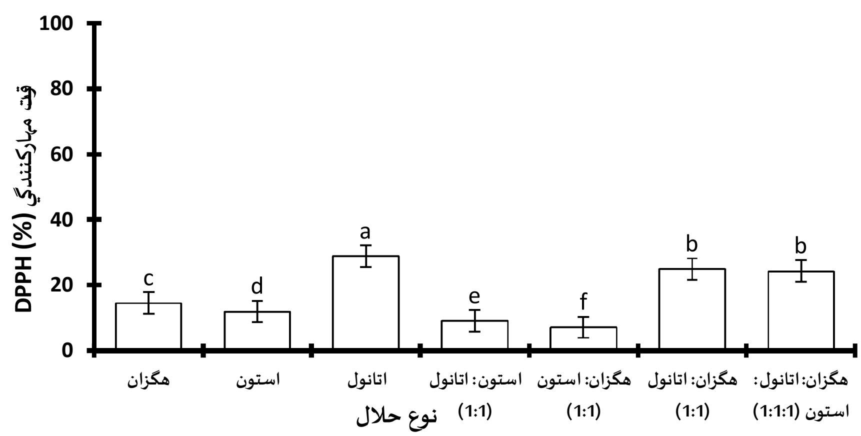
مشخص نمود (۵۳/۰۲٪).



شکل ۷- نمودار قدرت مهارکنندگی DPPH عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از انواع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در کدوی خشک‌شده
(حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

ت) کدو حلوایی پخته و خشک‌شده

در نمودار شکل (۸) قابلیت مهارکنندگی DPPH توسط عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل شده از کدوی پخته و خشک شده مشاهده می‌گردد. همانگونه که مشخص است خاصیت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها در قیاس با سایر نمونه‌های کدو، کاهش قابل توجهی یافته است و بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره به‌دست آمده از اتانول می باشد (۲۸/۸۲٪) که علت آن می‌تواند مرتبط با ویژگی‌های شیمیایی خود عصاره حاصل‌شده باشد.



شکل ۸- نمودار قدرت مهارکنندگی DPPH عصاره‌های کاروتنوئیدی حاصل‌شده از انواع حلال‌های مختلف و نسبت‌های آن‌ها در کدوی پخته و خشک‌شده (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشد)

به‌طور کلی مولکول‌های کاروتنوئید در ماتریکس نمونه نسبتا پایدار هستند اما در حالت محلول و پس از استخراج، نسبت به نور، گرما، اکسیژن و اسید بسیار حساس می‌شوند (آموریم- کاریلهو و همکاران، ۲۰۱۴). مطابق با نتایج به‌دست آمده، به غیر از عصاره استخراج شده از کدوی پخته و خشک شده، سایر نمونه‌های کدو تقریبا خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشابهی را نشان دادند که البته متاثر از نوع حلال نیز اختلاف معنی‌داری مابین آن‌ها مشاهده گردید ($p < ۰/۰۵$)؛ به‌طوری که بیشترین قدرت مهارکنندگی DPPH در عصاره استخراج شده از کدوی خام با ترکیب ۱:۱ از هگزان: استون و برابر با ۶۳/۱۴٪ به‌دست آمد. نتایج بررسی قدرت مهارکنندگی DPPH توسط عصاره استخراج شده از کدوی گونه *Cucurbita maxima* با روش CO_2 فوق بحرانی و در دماهای ۵۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، به

ترتیب برابر با ۷۹/۹۰٪ و ۷۴/۸۹٪ گزارش شدند (شی، ۲۰۱۳) که نشان می‌دهد عصاره کاروتنوئیدی استخراج شده در این تحقیق با کمک حلال، دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی می‌باشد. از سوی دیگر، علت کاهش قدرت مهارکنندگی DPPH عصاره حاصل شده از کدوی پخته و خشک شده را می‌توان به استخراج ترکیبات کاروتنوئیدی مختلف با ساختارهای متفاوت در این نمونه نسبت داد (با توجه به بالاتر بودن راندمان استخراج کاروتنوئید از این نمونه کدو در مقایسه با کدوهای دیگر که در بخش‌های قبلی در مورد آن بحث شد) که خود باعث شده است تا در این نمونه، بیشترین قابلیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره به‌دست آمده از حلال اتانول (۲۸/۸۲٪) که حلالی قطبی است، مشاهده شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان دادند که مابین حلال‌های مورد بررسی در این تحقیق، هگزان و پس از آن نسبت ۱:۱ (حجمی) هگزان: استون به‌ترتیب بیشترین توانایی استخراج کاروتنوئیدها را از نمونه‌های کدو داشته و این در حالی است که مابین نمونه‌های کدوی مورد آزمون نیز، کدوهای پخته و خشک شده، بیشترین راندمان استخراج کاروتنوئیدها را از خود نشان دادند. از سوی دیگر قدرت مهارکنندگی DPPH یا فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کدوی خام استخراج شده با نسبت ۱:۱ (حجمی) هگزان: استون، بیشتر از سایر نمونه‌ها به‌دست آمد.

منابع

Amorim-Carrilho, K.T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. 2014. Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, 56: 49–73.

Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O., & Azizah, M. 2009. Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging activity of pumpkin (*Cucurbita moschato*). *International Food Research Journal*, 16: 45–51.

Barth, M. M., Zhou, C., Kute, K. M., & Rosenthal, G. A. 1995. Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2876–2878.

de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., de Oliveira Godoy, R. L., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A., & Ramos, S. R. R. 2012. Total carotenoid content, α-carotene and β-carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata Duch*): A preliminary study. *Food Research International*, 47: 337–340.

Griffiths, J. C. 2005. Coloring Foods & Beverages. *Food Technology*, 59: 38–44.

Gu, Z., Chen, D., Han, Y., Chen, Z., & Gu, F. 2008. Optimization of carotenoids extraction from Rhodobacter sphaeroides. LWT- *Food Science and Technology*, 41: 1082–1088.

Ishida, B. K., & Chapman, M. H. 2008. Carotenoid extraction from plants using a novel, environmentally friendly solvent. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57: 1051–1059.

Norshazila, S., Irwandi, J., Othman, R., & Yumi Zuhanis, H. H. 2012. Scheme of obtaining β-carotene standard from pumpkin (*Cucurbita moschata*) flesh. *International Food Research Journal*, 19(2): 531–535

Prasad, K. N., Chew, L. Y., Khoo, H. E., Yang, B., Azlan, A., & Ismail, A. 2011. Carotenoids and antioxidant capacities from Canarium odontophyllum Miq. Fruit. *Food chemistry*, 124: 1549-1555.

Seo, J. S., Burri, B. J., Quan, Z., & Neidlinger, T. R. 2005. Extraction and chromatography of carotenoids from pumpkin. *Journal of Chromatography* A, 1073: 371–375.

Shi, J., Yi, C., Ye, X., Xue, S., Jiang, Y., Ma, Y., & Liu, D. 2010. Effects of supercritical CO_2 fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin. LWT - *Food Science and Technology*, 43: 39–44.

Shi, X., Wu, H., Shi, J., Xue, S., Wang, D., Wang, W., Cheng, A., Gong, Z., Chen, X., & Wang, C. 2013. Effect of modifier on the composition and antioxidant activity of carotenoid extracts from pumpkin (*Cucurbita maxima*) by supercritical CO_2. LWT - *Food Science and Technology*, 51: 433–440.

Thompson, K. A., Marshall, M. R., Sims, C. A., Wei, C. I., Sargent, S. A., & Scott, J. W. 2000. Cultivar, maturity, and heat treatment on lycopene content in tomatoes. *Journal of Food Science*, 65 (5): 791–795.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 2, June. July. 2017, p. 426- 435

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۳۹۶ ص.۴۳۵-۴۲۶

Brief report

Investigation on the Effects of Various Solvents on the Extraction of Carotenoids with Antioxidant Activity from Pumpkin

J. Mahdizade Moghaddam[1], S. Rahimi[2*]

Received: 2015.08.02
Accepted: 2016.01.03

Introduction: Pumpkin is one of the agricultural products that despite its very low price, is known as a rich source of carotenoids with high antioxidant activity. Iran is one of the good producers of pumpkin at the world with fifth rank which is cultivated at provinces like Mazandaran, Guilan, Khorasan, and Hamedan and so on extensively. Pumpkin is almost available for entire the year but many of them is spoiled and perished because of low storage equipments; on the other hand, unfortunately this valuable vegetable which is full of many types of carotenoids with high nutritive values, is not consumed by most of Iranian peoples, because of its low sensory properties such as no pleasant taste or odor; whereas it is used at many cuisines at other countries, especially North America. The pumpkin carotenoids contain natural pigment, beta- carotene and lycopene which can be used as natural colorant at food processed products or dietary supplements. Nowadays, the positive health effect of carotenoids such as improvement of eyesight, fetus growth, prevention from cardiovascular disease and cancer, maintenance of skin health and whole of body, anti blood hypertension and cholesterol is known, well, hence it must more be emphasized at household food basket. There are many researches about extraction of carotenoids form tomato, carrot, yeast and so on, but studying the pumpkin carotenoids was done less. Generally, due to the hydrophobic characteristic of carotenoids and their little solubility at water, organic solvents such as hexane are applied for their extraction, which some researches had been done about its solubility at different organic solvents, yet.

Materials and methods: In this research the ripped pumpkins (*Curcurbita moschata*) were cultivated at private farm at Khorasan were rinsed and chopped to same cubes. Then, pumpkin cubes were peeled off and the seeds were removed. For extraction of carotenoids, the pumpkin specimens prepared at four states of raw (mashed pumpkin), cooked (mashed pumpkin), dried (40 °C) (powder) and dry powder of cooked pieces (40 °C). Carotenoids were extracted from pumpkin samples by various organic solvents such as hexane, acetone, ethanol, at different volume ratio of them like 1:1(v) and 1:1:1(v). When the pumpkins became colorless, the extract had been evaporated at a vacuumed rotating evaporator to gain a thick extract without any solvent. The extract had been gathered and stored at black bottles and refrigerator to minimize the side effects of light and heat on nutritive characteristics of carotenoids. The total carotenoids content of the pumpkin extracts was measured by spectrophotometric method at 480 nm according to beta- carotene. The antioxidant activity of the extracts was calculated on the basis of DPPH scavenging activity of the samples at 517 nm. The project was done on a complete random design and one-way ANOVA and Duncan test were used for statistical data analysis and clearance the significant difference among treatments at 95% confidence level.

Results & Discussions: Statistical analysis of the results showed that various organic solvents, their volume ratio and also various state of pumpkin specimens had a significant effect on the carotenoid extraction from pumpkin samples ($p<0.05$) which the most efficiency of carotenoid extraction equal to16.74 μg/g, gained by hexane and dry powder of cooked pumpkins and secondly, the 1:1(v) hexane: acetone mix solvent showed the more extraction efficiency for all of the pumpkin samples. Ethanol showed the least ability for extraction of carotenoids from pumpkin samples. According to the antioxidant activity, the effect of type of organic solvent,

1. MSc Graduate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Novel Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Technology, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: s.rahimi@irost.ir).

their ratio and also various state of pumpkin specimens were significant for all carotenoid extracts ($p<0.05$) and the raw mashed pumpkin extract that obtained by 1:1(v) hexane:acetone mix had noticeable DPPH scavenging activity (63.14%). The cooked, dried and dry powder of cooked pieces of pumpkin showed a little antioxidant activity despite of high carotenoid extraction efficiency, probably because of extraction of various carotenoids with different structures as well as different scavenging activities of DPPH which can impact on the calculation of the antioxidant activity. Thus, studying the effect of temperature on extraction efficiency and nature of pumpkin carotenoids and their stability at environmental conditions is needed to introducing the carotenoids extracted from pumpkin as a natural colorant to addition of many of food products as a rich source of antioxidants and finally promotion of society health.

Keywords: Pumpkin; Extraction; Carotenoid; Organic Solvent; DPPH Scavenging Activity.